Rec'd PCT/PTO 07 FEB 2005
PCT/JP03/09888

04.08.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 19 SEP 2003
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: ２００２年　８月　９日

出願番号
Application Number: 特願２００２－２３３４６７

[ST. 10/C]: [ＪＰ２００２－２３３４６７]

出願人
Applicant(s): アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

２００３年　９月　５日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office
今井康夫

出証番号　出証特２００３－３０７２７１６

【書類名】　特許願
【整理番号】　P14-266809
【提出日】　平成14年 8月 9日
【あて先】　特許庁長官殿
【国際特許分類】　C07D311/08
G01N 31/22
G01N 33/52
G01N 33/68
【発明の名称】　蛋白質測定方法、蛋白質測定用指示薬、および蛋白質測定用試験片
【請求項の数】　6
【発明者】
【住所又は居所】　京都府京都市南区東九条西明田町５７　アークレイ株式会社内
【氏名】　小坂　秀子
【特許出願人】
【識別番号】　000141897
【住所又は居所】　京都府京都市南区東九条西明田町５７
【氏名又は名称】　アークレイ株式会社
【代理人】
【識別番号】　100086380
【弁理士】
【氏名又は名称】　吉田　稔
【連絡先】　０６－６７６４－６６６４
【選任した代理人】
【識別番号】　100103078
【弁理士】
【氏名又は名称】　田中　達也

【選任した代理人】
　【識別番号】　100105832
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　福元　義和
【選任した代理人】
　【識別番号】　100117167
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　塩谷　隆嗣
【選任した代理人】
　【識別番号】　100117178
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　古澤　寛
【手数料の表示】
　【予納台帳番号】　024198
　【納付金額】　21,000円
【提出物件の目録】
　【物件名】　明細書　1
　【物件名】　要約書　1
　【包括委任状番号】　0103432
【プルーフの要否】　要

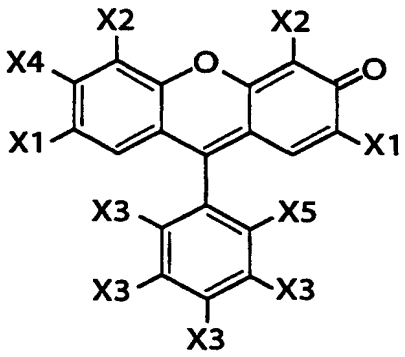
【書類名】　明細書

【発明の名称】　蛋白質測定方法、蛋白質測定用指示薬、および蛋白質測定用試験片

【特許請求の範囲】

【請求項１】　蛋白質を測定するための方法であって、蛋白質測定用指示薬として、下記化学式１で示される化学構造を有するものを使用することを特徴とする、蛋白質測定方法。

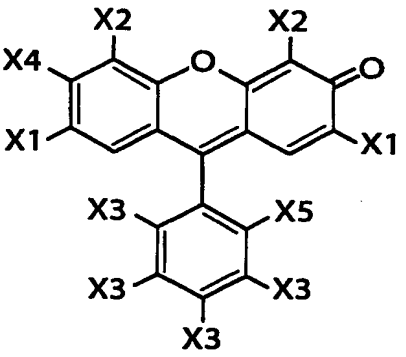
【化１】



（化学式１において、Ｘ１はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基、Ｘ２はハロゲン、Ｘ３はハロゲンまたは水素、Ｘ４は水酸基またはその塩、Ｘ５はカルボキシル基またはその塩である。）

【請求項２】　蛋白質を測定するための指示薬であって、下記化学式２で示される化学構造を有することを特徴とする、蛋白質測定用指示薬。

【化２】



（化学式２において、Ｘ１はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基、Ｘ２はハロ

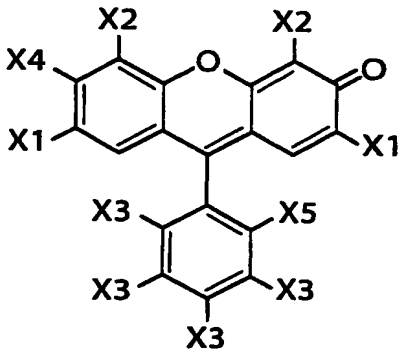
ゲン、Ｘ３はハロゲンまたは水素、Ｘ４は水酸基またはその塩、Ｘ５はカルボキシル基またはその塩である。）

【請求項３】　上記化学式２において、Ｘ１はヨウ素、臭素、塩素またはニトロ基、Ｘ２はヨウ素または臭素、Ｘ３は塩素、臭素または水素である、請求項２に記載の蛋白質測定用指示薬。

【請求項４】　上記化学式２において、Ｘ１およびＸ２はヨウ素または臭素、Ｘ３は塩素である、請求項３に記載の蛋白質測定用指示薬。

【請求項５】　蛋白質を定量するための使用される試験片であって、蛋白質定量指示薬として、下記化学式３で示される化学構造を有するものを使用することを特徴とする、蛋白質測定用試験片。

【化３】



（化学式３において、Ｘ１はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基、Ｘ２はハロゲン、Ｘ３はハロゲンまたは水素、Ｘ４は水酸基またはその塩、Ｘ５はカルボキシル基またはその塩である。）

【請求項６】　蛋白質に対する発色感度を高めるための増感剤をさらに含んでいる、請求項５に記載の蛋白質測定用試験片。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料（たとえば血液、尿）中に存在する蛋白質を測定するための技術に関する。

【０００２】

【従来の技術】

生体試料中の蛋白質を測定することは、病理学的診断において重要である。たとえば、肝臓機能が低下した場合には、血清アルブミンの量が減少する一方、腎炎、ネフローゼ症候群、結石、腫瘍等の腎・尿路疾患、循環系及び中枢神経系の疾患などの場合には、尿中の蛋白質の量が増加する。したがって、アルブミンなどの蛋白質を測定することは、これらの疾患の診断において重要な指針となり得るのである。

【０００３】

蛋白質測定の分野においては、蛋白質誤差指示薬を用いた簡便な測定方法が知られている。この測定方法では、蛋白質誤差指示薬として、たとえばテトラブロムフェノールブルー（ＴＢＰＢ）が用いられており、一例を挙げれば、ＴＢＰＢを用いた尿試験紙が一次スクリーニング用として広く用いられている。ＴＢＰＢは、蛋白質が存在すると、本来は解離しない低いｐＨ３付近でフェノール性ヒドロキシル基の解離が起こり、黄色から青色に変化するため、蛋白質を検出することができる。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、ＴＢＰＢを指示薬として用いた試験紙は、臨床的に必要とされる１０～２０ｍｇ／ｄＬの低濃度蛋白質に対する検出感度が不充分なため、蛋白質を正確に検出できない場合がある。たとえば、カラーチャートとの比較により行われる目視判定においては、陰性蛋白質と痕跡蛋白質の色が近いために区別が難しく判定が困難である。一方、尿試験紙の測定装置を用いる場合においても、ＴＢＰＢの感度が低いためにしばしば判定を誤る場合がある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

そのため、低濃度な蛋白質をより高感度に定量できる技術、とくにＴＢＰＢ以外の新規な指示薬の開発が望まれていた。そこで、本発明者は、低濃度の蛋白質を高感度で測定するための指示薬をスクリーニングした結果、特定のハロゲン化キサンテン系色素が目的の指示薬として好適であることを見出し、本発明を完成

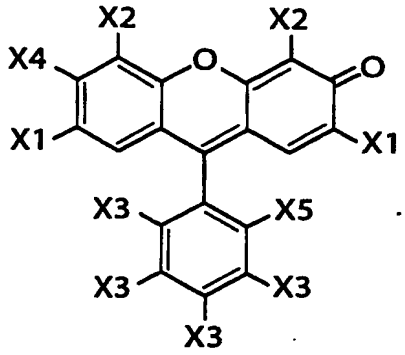
するに至った。

【０００６】

すなわち、本発明では、下記化学式４で示される化学構造を有する蛋白質測定用指示薬、この蛋白質測定用指示薬を使用する蛋白質測定方法および蛋白質測定用試験片が提供される。

【０００７】

【化４】



【０００８】

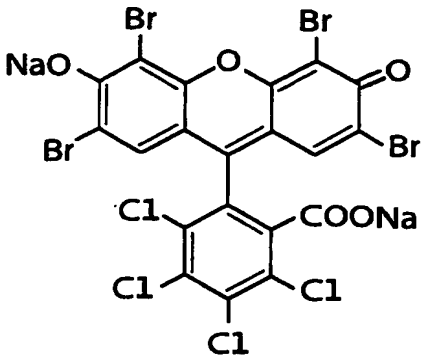
化学式４において、Ｘ１はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基、Ｘ２はハロゲン、Ｘ３はハロゲンまたは水素、Ｘ４は水酸基またはその塩、Ｘ５はカルボキシル基またはその塩である。本発明の蛋白質測定用指示薬としては、化学式４において、Ｘ１がヨウ素、臭素、塩素またはニトロ基、Ｘ２がヨウ素または臭素、Ｘ３が塩素、臭素または水素のものを使用するのが好ましく、最も好ましくは、Ｘ１およびＸ２がヨウ素または臭素、Ｘ３が塩素のものが使用される。Ｘ４およびＸ５における塩としては、典型的にはＮａ塩が挙げられる。

【０００９】

本発明の蛋白質測定用指示薬としては、典型的には、下記化学式５ないし９に示したものが挙げられる。その中でもとくに、下記化学式５および６の蛋白質測定用指示薬が好ましい。

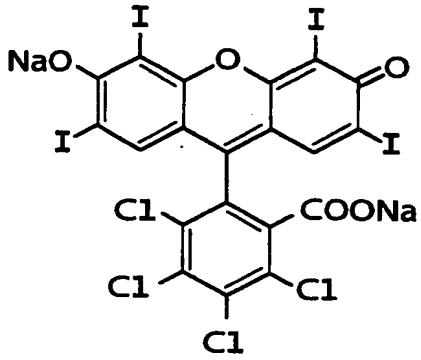
【００１０】

【化５】



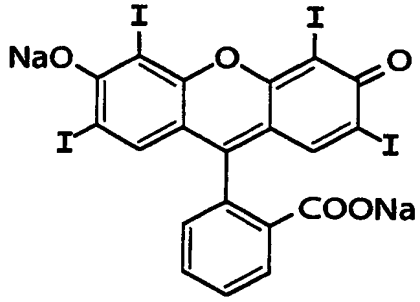
【００１１】

【化６】



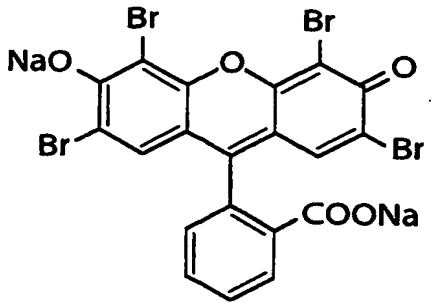
【００１２】

【化７】



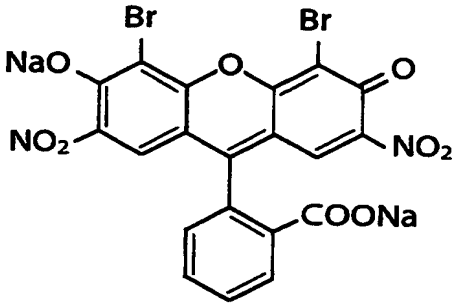
【００１３】

【化８】



【００１４】

【化９】



【００１５】

これらのハロゲン化キサンテン系色素は、ｐＫａ以下のｐＨにおいては蛋白質が共存しなければ無色～淡橙色である一方、蛋白質が共存すれば赤～紫色に変色する。そのため、ＴＢＰＢのように黄色から青色に変色する場合に比べれば、元の色が無色～淡色であるために色の変化を検知しやすい。したがって、上述のハロゲン化キサンテン系色素を用いれば、目視判定であるか、測定装置を用いた判定であるかを問わず、低濃度蛋白質を適切に検知することができるようになる。

【００１６】

本発明の蛋白質定量用試験片は、上述したハロゲン化キサンテン系色素、緩衝剤、増感剤などを含有する含浸液に吸収性担体を浸み込ませ、これを乾燥させることにより製造することができる。試験片はそのまま使用することができるが、非吸収体に接着させて使用することもできる。

【００１７】

含浸液中のハロゲン化キサンテン系色素の濃度は、特に限定されないが、典型

的には０．１～１０mM、好ましくは０．５～２mMとされる。

【００１８】

含浸液のｐＨは、たとえば本願のハロゲン化キサンテン系色素のｐＫａ値よりやや低い値である１．５～４．５とされ、好ましくは２．０～３．５とされる。

【００１９】

緩衝剤としては、ｐＨ１．５～４．５の範囲で良好な緩衝能を有し、ハロゲン化キサンテン系色素と蛋白質との反応を阻害しないものであれば何れでもよい。緩衝剤としては、たとえばグリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、あるいは酒石酸緩衝液を用いることができる。含浸液中の緩衝剤の濃度は、特に限定されないが、典型的には０．１～１．５M、好ましくは０．３～１Mとされる。

【００２０】

増感剤としては、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリカーボネート、ポリビニルエーテルを使用することができ、好ましくはポリエチレングリコールやポリプロピレングリコールが使用される。含浸液中の増感剤の濃度は、特に限定されないが、典型的には０．０５～５ｗｔ％、好ましくは０．１～１ｗｔ％とされる。

【００２１】

吸収性担体としては、蛋白質成分を含まない多孔性物質を使用することができ、たとえばシート状または膜状の形態のものが使用される。多孔性物質としては、たとえば紙状物、フォーム（発泡体）、織布状物、不織布状物、編物状物が挙げられる。吸収性担体を形成するための材料としては、たとえば綿、麻、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ロックウール、ガラス繊維、シリカ繊維、カーボン繊維、ボロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、レーヨン、ポリエステル、ナイロン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリオレフィンが挙げられる。これら吸収性担体の形状は、特に限定されないが、矩形、長矩形、円形あるいは楕円形が一般的である。

【００２２】

非吸収体としては、たとえばシート状または膜状の形態のものが使用される。非吸収体を形成するための材料としては、たとえばポリエチレンテレフタレート、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレンが挙げられる。

【００２３】

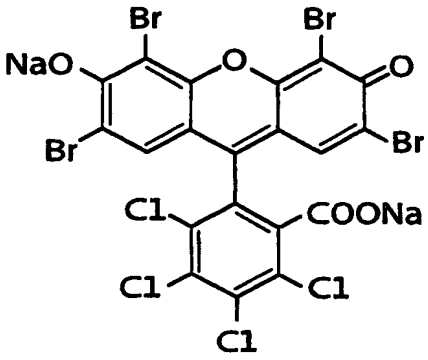
【実施例】

実施例１（指示薬のスクリーニング）

スクリーニングは、スクリーニング液に０．５ｍＭとなるように対象化合物を添加し、その発色性を目視により観察することにより行った。スクリーニング液としては、０．７Ｍリンゴ酸緩衝液（ｐＨ２．２）に、アルブミン１５ｍｇ／ｄＬ、ポリエチレングリコール０．５ｗｔ％を溶解させたものを使用した。対象化合物としては、市販されている種々の色素を用いた。その結果、下記化学式１０～１４に示す５つの化合物について良好な発色が見受けられた。これらの化合物の入手先については、表１に示した通りである。

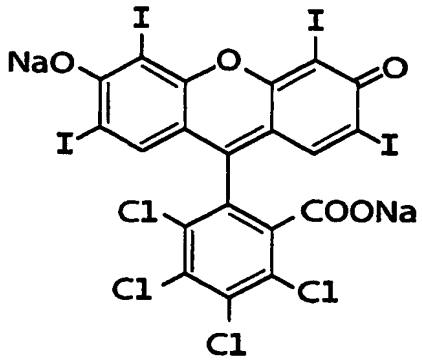
【００２４】

【化１０】



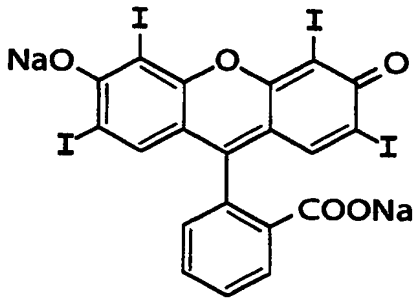
【００２５】

【化１１】



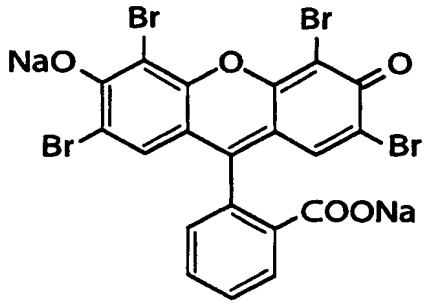
【００２６】

【化１２】



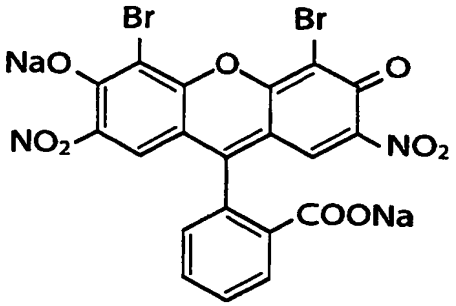
【００２７】

【化１３】



【００２８】

【化１４】



【００２９】

【表１】

化学式番号	商品名	製造元
１０	フロキシンＢ	東京化成株式会社
１１	ローズベンガル	東京化成株式会社
１２	エリスロシンＢ	東京化成株式会社
１３	エオシンＹ	和光純薬工業株式会社
１４	エオシンＢ	東京化成株式会社

【００３０】

実施例２（感度評価）

本実施例では、アルブミン濃度が０．３ｍｇ／ｄＬ（陰性）または１５ｍｇ／ｄＬ（陽性）の尿を試験片に含浸させ、それぞれについて反射率を測定した。試験片は、表２に示した組成の含浸液を濾紙（Ｗｈａｔｍａｎ社製「３ＭＭＣｈｒ」）に含浸させた後にそれを乾燥させることにより形成した。反射率は、色差計を用いて測定した。各サンプルの測定結果については、表３に示した。表３には、各サンプルの測定波長についても同時に示した。

【００３１】

【表２】

	指示薬	緩衝液	増感剤	溶媒
サンプル１	フロキシンB 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH2.2)	ポリエチレングリコール 0.5wt%	エタノール 40wt%
サンプル２	フロキシンB 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH2.2)	なし	エタノール 40wt%
サンプル３	ローズベンガル 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH2.6)	ポリプロピレングリコール 0.5wt%	エタノール 40wt%
サンプル４	ローズベンガル 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH2.6)	なし	エタノール 40wt%
サンプル５	ＴＢＰＢ 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH3.4)	ポリエチレングリコール 0.5wt%	エタノール 30wt%
サンプル６	ＴＢＰＢ 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.7M(pH3.4)	なし	エタノール 30wt%

注：ＴＢＰＢ＝テトラブロムフェノールブルー

【００３２】

【表３】

	測定波長	反射率（%）		差分⊿
		0.3mg/dl（陰性）	１５mg/dl（陽性）	
サンプル１	５６０nm	６５．８	３８．２	２７．７
サンプル２	５６０nm	６１．５	３８．３	２３．２
サンプル３	５６０nm	６５．７	４０．７	２５．０
サンプル４	５６０nm	６１．６	４１．６	２０．０
サンプル５	６３０nm	５７．０	４０．４	１６．６
サンプル６	６３０nm	６０．７	４８．９	１１．８

【００３３】

表３より明らかなように、指示薬として化学式１０に示したフロキシンＢを用いたサンプル１，２や化学式１１に示したローズベンガルを用いたサンプル３，４は、指示薬としてＴＢＰＢを用いたサンプル５，６に比べて、アルブミン濃度が０．３ｍｇ／ｄＬ（陰性）のときの反射率が大きく、アルブミン濃度が１５ｍｇ／ｄＬ（陽性）のときの反射率が小さくなっている。つまり、フロキシンＢやローズベンガルは、これらのｐＨ条件下で無色であるためにＴＢＰＢに比べて非発色時（陰性）の光吸収量が少なく、その反面、発色時（陽性）の光吸収量が大

きくなっている。このため、フロキシンＢやローズベンガルは、陰性の尿と陽性の尿の反射率の差分Δが大きく、その差分はＴＢＰＢの２倍程度となっている。したがって、フロキシンＢやローズベンガルは、アルブミンに対する感度が高く、アルブミン濃度が１０～２０ｍｇ／ｄＬ程度の低濃度であっても、適切にアルブミンを検出できるといえる。

【００３４】

一方、本発明者は、各サンプルについて目視判定に試みたところ、フロキシンＢやローズベンガルを用いたサンプル１～４は、アルブミン濃度が１５ｍｇ／ｄＬのときに無色から赤色に発色し、その発色（陽性）を容易に確認できた。それに対して、ＴＢＰＢを用いたサンプル５，６は、アルブミン濃度が１５ｍｇ／ｄＬのときには、陰性のときの黄色と殆ど差がなく、目視では発色の有無を検出するのが困難であった。このように、指示薬としてフロキシンＢやローズベンガルを用いた場合には、アルブミン濃度が低い場合であっても、目視により容易にアルブミンを検出することができる。

【００３５】

【発明の効果】

本発明は、低濃度な蛋白質（特にアルブミン）であっても、高感度にアルブミンを検出することができる。

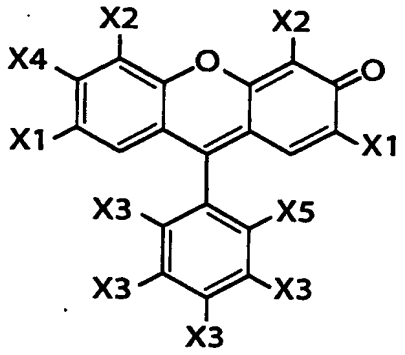
【書類名】　要約書

【要約】

【課題】　低濃度な蛋白質をより高感度に定量できるようにする。

【解決手段】　本発明においては、下記化学式１５で示される化学構造を有する蛋白質測定用指示薬、この蛋白質測定用指示薬を使用する蛋白質測定方法および蛋白質測定用試験片が提供される。

【化１５】



化学式１５において、Ｘ１はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基、Ｘ２はハロゲン、Ｘ３はハロゲンまたは水素、Ｘ４は水酸基またはその塩、Ｘ５はカルボキシル基またはその塩である。

【選択図】　なし

特願２００２－２３３４６７

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　［０００１４１８９７］

１．変更年月日　　１９９０年　８月１１日
［変更理由］　新規登録
住　所　　京都府京都市南区東九条西明田町５７番地
氏　名　　株式会社京都第一科学

２．変更年月日　　２０００年　６月１２日
［変更理由］　名称変更
住　所　　京都府京都市南区東九条西明田町５７番地
氏　名　　アークレイ株式会社